

UNTERSUCHUNGEN ZUM METABOLISMUS VON
 7α -³H-TESTOSTERON-SULFAT
NACH INTRAVENÖSER INJEKTION

AXEL SCHRÖDER

1978
—

Aus der
Universitäts-Frauenklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Metabolismus von
 7α - ^3H -Testosteron-sulfat
nach intravenöser Injektion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Axel Schröder

aus Eutin

Mainz 1977

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. C.-H. Schweikert

1. Gutachter:

Professor Dr. P. Knapstein

2. Gutachter:

Professor Dr. V. Friedberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Januar 1978

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLEN 1 · RUF 0 61 32 / 57 11



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. <u>EINLEITUNG</u>	1
II. <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	3
A. Allgemeiner Testosteron-Metabolismus	3
B. Testosteron-sulfat-Metabolismus	10
III. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	18
A. Durchführung des Experiments	18
B. Chemische Aufarbeitung des Materials	18
1) Plasma	18
2) Urin	19
3) Charakterisierung freier Steroide	20
4) Derivatbildung	21
<u>TABELLEN</u> und <u>ABBILDUNGEN</u>	22
IV. <u>ERGEBNISSE</u>	26
V. <u>DISKUSSION</u>	29
VI. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	33
VII. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	34
<u>LEBENS LAUF</u>	
<u>DANKSAGUNG</u>	

Testosterone

A hairy chest and hairy chin
are doubtlessly so masculine,
with bulging muscles, hard as stone
it's all due to testosterone.
Receding hairline, loss of hair,
they also have a manly air,
with arteries as hard as stone
a fickle friend, testosterone!

J.B.

I. EINLEITUNG

Seit die Steroidsulfate nicht mehr länger nur als Ausscheidungsprodukte des Steroidstoffwechsels angesehen werden, sondern auch als Substrate in der Hormonbiosynthese (CALVIN et al., 1963) und als Sekretionsprodukte endokriner Gewebe gelten (WALLACE et al., 1963), ist das Interesse an Untersuchungen über den Metabolismus von Testosteron-sulfat gestiegen. Trotzdem liegen bisher erst wenige Ergebnisse über die physiologische Bedeutung und den Katabolismus von sulfokonjugiertem Testosteron vor, während der Stoffwechsel des freien Testosterons sowohl in vitro als auch in vivo weitgehend abgeklärt wurde.

Das Testosteron-sulfat unterliegt wie andere Steroidkonjugate einem Metabolismus im menschlichen Körper, der entweder "direkt", d.h. ohne eine Aufspaltung der Esterbindung des Steroidmoleküls erfolgt (BAULIEU, 1963) oder aber "indirekt", also über eine Hydrolyse abläuft (TWOMBLY et al., 1960).

In einer umfassenden Studie von BAULIEU et al. (1965) über den Stoffwechsel konjugierter Steroide ergab sich nach intravenöser Injektion von $1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Testosteron-sulfat eine Ausscheidung des sulfokonjugierten Testosterons von nur 3,5 % mit dem Urin in fünf Tagen, was auf einen direkten Metabolismus schließen ließ. Andere ^{14}C -markierte Metabolite wurden bei diesem Versuch nicht identifiziert, ein Umstand, der möglicherweise in der zu geringen Ausgangsdosis begründet lag. Untersuchungen von KNAPSTEIN et al. (1972) zeigten hingegen einerseits eine geringe und langsame Elimination des Testosteron-sulfats mit dem Urin, andererseits wies man jedoch eine direkte und indirekte Verstoffwechselung nach. Da diese experi-

mentellen Untersuchungen von KNAPSTEIN und Mitarbeitern mit unterschiedlich markiertem freien und sulfokonjugierten Testosteron durchgeführt worden waren und die daraus resultierenden Befunde meist schwierig zu interpretieren sind, sollten die gewonnenen Ergebnisse in der vorliegenden Studie mittels einfach radioaktiv markierten Testosteron-sulfats überprüft werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

A. Allgemeiner Testosteron-Metabolismus

Testosteron ist das männliche Sexualhormon mit der stärksten androgenen Wirksamkeit. Nach Untersuchungen von SAVARD et al. (1952) und später von WOTIZ et al. (1960) dient Acetat als Grundbaustein für die Hormonbiosynthese. MENON et al. (1965) fanden heraus, daß der Aufbau über Cholesterin verläuft, welches in weiteren Syntheseschritten in Pregnenolon umgewandelt wird. Von dieser Substanz können nun verschiedene Wege zum Testosteron führen: z.B. über 17α -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendiol (sog. Δ^5 -Weg) oder aber über Progesteron, 17α -Hydroxyprogesteron und Androstendion (ADN) auf dem sog. Δ^4 -Weg (TAMM, 1967). Das ADN besitzt dabei eine Schlüsselstellung, da es selbst aus DHEA und Testosteron entstehen kann.

Wichtigster Produktionsort des männlichen Geschlechtshormons sind die Hoden, die quantitativ den größten Prozentsatz erzeugen. Weniger bedeutend sind das Ovar und die Nebennierenrinde, die beim Manne mit ca. 10 % an der Synthese beteiligt ist. Die Regulation der Testosteronsekretion erfolgt im übergeordneten Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-System des Gehirns. Das hypophysäre Gonadotropin ICSH (=interstitial-cell-stimulating hormone) stimuliert den Produktionsanteil in Testikeln und Ovarien durch Beschleunigung der Syntheseschritte von Cholesterin zu Pregnenolon (HALL et al., 1964). Auch das in der Plazenta gebildete Gonadotropin HCG (=human chorionic gonadotropin) weist einen stimulierenden Effekt auf, in dem es nach Ergebnissen von RICE et al. (1964) den Testosteronaufbau bis auf das neunfache zu steigern vermag. Die Mittlersubstanz für die Gonadotropinwirkung in den Keim-

drüsen ist zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (DORFMAN et al., 1965). Auf die Nebennierenrinde wirkt hypophysäres ACTH mit einem Anstieg der Testosteron-Produktionsrate (TPR).

Bei Frauen kommt der Einfluß der Gonadotropine besonders zum tragen, weil je nach Zyklusphase unterschiedliche ADN- und Testosteron-Konzentrationen im Plasma und Urin auftreten. Zur Zeit der Follikelreifung überwiegt das ADN, in der frühen Lutealphase dagegen das Testosteron (KUMARI et al., 1966). Weiterhin regulativ wirksam sind der physiologische Alterungsprozeß über eine Abnahme der Konzentration organspezifischer Enzyme und eine längere therapeutische Östrogeneinnahme über eine Hemmung der ICSH-Ausschüttung. Beides verursacht ein Absinken des Testosteronspiegels.

Testosteron ist nach WILSON (1972) ein im Plasma kreisendes Präandrogen. In den verschiedenen Zielorganen wird es durch 5 α -Reduktase zu 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT) reduziert und an ein spezifisches Rezeptorprotein gekoppelt (ITO et al., 1971). Die Bedeutung von 5 α -DHT als Mittler vieler Aktionen der Androgene wurde erst augenscheinlich, als es von BRUCHOVSKY et al. (1968) als das Hauptsteroid des Zellkerns - dem eigentlichen androgenen Wirkungsort innerhalb der Zelle - entdeckt wurde. Unabhängig davon bestätigten im gleichen Jahr ANDERSON und LIAO die Reduktion von Testosteron zu 5 α -DHT im endoplasmatischen Retikulum. Das bedeutet, daß Testosteron eigentlich nur eine von den Produktionsorganen ins Blut sezernierte "Transportform androgener Aktivität" darstellt (TAMM et al., 1971).

Nach Bestimmungen von BURGER et al. (1964) und HORTON

(1965) finden sich im peripheren Plasma folgende Konzentrationen in $\mu\text{g}\%$:

	Testosteron	ADN	Testosteron/ADN
Männer	0,670	0,077	8,7/1
Frauen	0,065	0,160	1/2,5

Der Testosteronspiegel ist dementsprechend beim männlichen Geschlecht ca. 10mal höher als bei der Frau, seine ADN-Konzentration jedoch nur ca. halb so groß.

Die TPR setzt sich aus der Sekretionsrate und einem Anteil, der im peripheren Plasma durch Umwandlung aus ADN und DHEA entstehen kann, zusammen. Für die Bestimmung der Urin-TPR ist es somit wichtig zu wissen, daß ein Teil der Urinmetaboliten des Testosterons auch aus ADN und DHEA entstehen kann. Experimentelle Bestimmungen von HORTON et al. (1965) führen zu folgenden mittleren Produktionsraten in $\text{mg}/24 \text{ h}$:

	Plasma-TPR	Urin-TPR
Männer	6,3	6,7
Frauen	0,5	1,5

Beim Mann ist also die TPR im Plasma und Urin nahezu identisch, wohingegen im weiblichen Organismus die Urin-TPR um 1 mg/Tag höher ist.

Von klinischer Bedeutung sind pathologische Testosteronwerte bei verschiedenen Symptomen bzw. Erkrankungen. So fanden KORENMAN et al. (1965) bei Virilisierung der Frau und bei Hirsutismus bis zum dreifachen angestiegene TPR. Es gelang diesen Autoren weiterhin, bei Patientinnen mit Stein-Leventhal-Syndrom, benignem Nebennierenadenom oder Adrenogenitalem Syndrom extrem erhöhte Tageswerte für Testosteron zu bestimmen. Eine entsprechende, über die Norm vermehrte TPR läßt sich auch bei analogen Erkrankungen des Mannes nachweisen, wie z.B. beim Leydigzell-Tumor.

Die Metabolisierung und Interkonversion der Androgene vollzieht sich relativ schnell. Schon 10 min nach intravenöser Applikation von radioaktiv markiertem Testosteron berechneten SANDBERG et al. (1956) als auch KNAPSTEIN et al. (1972) eine Plasma-Halbwertszeit von 8 bis 8,5 min. Konjugierte Metaboliten - wie Testosteronglucuronid - lassen sich bereits 10 - 15 min nach Injektion des männlichen Keimdrüsenhormons identifizieren. Untersuchungen von TAMM (1967) und KNAPSTEIN et al. (1972) weisen der Leber die zentrale Stellung in der Verstoffwechselung des Testosterons zu. Eine mit $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -Testosteron in vivo perfundierte Leber eines 40-jährigen Mannes hatte schon 1 min nach Infusion 72 % in Steroidkonjugate metabolisiert (WORTMANN et al., 1970).

Die Umwandlung von ADN in Testosteron und umgekehrt erfolgt vorwiegend extrahepatisch in verschiedenen peripheren Organen. Beim weiblichen Geschlecht entstammen 60 % des Plasma-Testosterons aus ADN. Nur knapp 3 % sind es dagegen beim Mann (TAMM, 1967). Ergänzend dazu fanden HORTON et al. (1966) heraus, daß im männlichen Organismus 35 % des ADN peripher aus Testosteron entsteht. Die

Vorstufen und Metaboliten des männlichen Sexualhormons - DHEA, Androsteron, Epiandrosteron und Ätiocholanolon - liegen im Plasma zum größten Teil als Sulfatester vor, was u.a. durch die wesentlich niedrigere renale Clearance der Sulfokonjugate gegenüber jener der Glucuronidkonjugate bedingt ist (SJÖVALL et al., 1965).

Den Hauptanteil der Testosteron-Abbauprodukte scheidet der menschliche Körper über die Nieren aus. 24 bis 48 h nach Injektion von ^{14}C -Testosteron treten 70 - 99 % der Aktivität wieder im Urin auf; weitere 5 % sind in den Faeces und ca. 14 % in der Galle nachzuweisen, so daß für einen Teil des Testosterons bzw. seiner Metaboliten ein enterohepatischer Kreislauf bestehen muß (SANDBERG et al., 1956). Die Hauptabbauwege von ADN und Testosteron verlaufen über dihydrierte Zwischenverbindungen - wie Androstandion - zu den "17-Hydroxyverbindungen": 5α - und 5β -Androstandiol. Außerdem werden die quantitativ und diagnostisch wichtigeren 17-Ketosteroide: Androsteron (= 5α -Androstanolon) und Ätiocholanolon (= 5β -Androstanolon) gebildet. Letztere resultieren zu etwa 50 % aus dem Abbau von DHEA und DHEA-sulfat (TAMM, 1967). Weitere Endprodukte des Testosteronabbaus sind Östron, Östradiol und das Testosteron-sulfat.

Durch die zahlreichen Vernetzungen im Stoffwechsel von DHEA, ADN und Testosteron bestehen auf jeder Abbaustufe verschiedene Übergangsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Steroiden. Die Analyse der Urinausscheidungen radioaktiv markierter Stoffwechselendprodukte des männlichen Geschlechtshormons zeigte nach WORTMANN et al. (1970) ein Überwiegen der Glucuronide in den ersten 12 h nach Injektion, demgegenüber ein Vorherrschen der Sulfate in der

zweiten Tageshälfte. Freie Steroide konnten im übrigen nicht identifiziert werden.

Quantitativ betrachtet dominieren als Abbauverbindungen die 17-Ketosteroidkonjugate mit 25 - 45 %; nur 5 % entfallen auf 5 α - und 5 β -Androstandiol. Ätiocholanolon-glucuronid ist das mengenmäßig bedeutendste Steroidkonjugat des Testosteronabbaus (BAULIEU et al., 1964).

Die Umwandlung des männlichen Keimdrüsenhormons in seine glucuroniierte Form beträgt nach MAUVAIS-JARVIS et al. (1965) etwa 1 %, während die Interkonversion in Testosteron-sulfat lediglich 0,1 % ausmacht (CAMACHO et al., 1964). Testosteronglucuronid stellt im übrigen keine Endstufe dieses Abbauprozesses dar. Es wird weiter zu 5 β -Androstandiol verstoffwechselt, was 25 % der Urinausscheidung dieser 17-Hydroxyverbindung entspricht. Da nun die Androstandiole sowohl Exkretionsprodukte der Androgene als auch Zwischenstufen für die Bildung von 17-Ketosteroiden sind, kann das aus dem Testosteronglucuronid entstandene 5 β -Androstandiol weiter zu Ätiocholanolon metabolisiert werden (VERMEULEN et al., 1966).

Nach Bestimmungen von BREUER (1962) beläuft sich die Umwandlungsrate von Testosteron in Östrogene nach hochdosierten Gaben des männlichen Geschlechtshormons auf 0,03 - 0,05 %. Bereits 5 min nach intravenöser Injektion lassen sich konjugierte Östrogene im Plasma nachweisen, wobei die Leber und die Gonaden die bevorzugten Orte der Interkonversion darstellen.

Am Ende dieser Übersicht sei kurz auf die wesentlichen Stoffwechselwirkungen des Testosterons im postnatalen Leben eingegangen. Ganz allgemein bezeichnet man nach OVERBEEK (1966) den Effekt des männlichen Sexualhormons

auf den menschlichen Gesamtstoffwechsel als "anabol", da es den Proteinumsatz und die Eiweißsynthese fördert. Eine global bestimmbare Stickstoffbilanz wird positiv. Ebenso läßt sich nach KRÜSKEMPER (1965) ein leichter Anstieg der Calcium- und Phosphorbilanz feststellen, was sich in einer Zunahme der Muskelmasse ausdrückt. Diese eiweißaufbauende Wirkung tritt besonders in den typischen "Erfolgsorganen" der Androgene, wie z.B. der Prostata, der Vesicula seminalis u.a. in Erscheinung.

Weiterhin beeinflußt das Testosteron die Reifung und Ernährung des Hodens, entwickelt den männlichen Behaarungstypus und stimuliert die Tätigkeit der Talgdrüsen im Sinne einer Funktionssteigerung durch Drüsenvergrößerung (STRAUSS et al., 1962). Auf die normale Skelettentwicklung (Wachstum, Knochenreifung und Epiphysenschluß) und die spätere Aufrechterhaltung der physiologischen Knochenstruktur hat es entscheidenden Einfluß. Libido und Potenz des Mannes regelt der Testosteronspiegel im Blut.

B. Testosteron-sulfat-Metabolismus

Als DE MEIO und LEWYCKA (1955) über enzymatische Aktivitäten von Steroid-sulfotransferasen in Rattenleberextrakten berichteten und BAULIEU (1960) nachweisen konnte, daß menschliche Nebennieren Steroidsulfate sezernieren, beeinflussten diese Ergebnisse über sulfokonjugierte Steroidhormone die spätere Forschung über das Testosteron-sulfat entscheidend mit. In einer Studie über nebennierenrinden-sezernierte Androgene kamen BAULIEU und Mitarbeiter (1965) zu dem Resultat, daß Testosteron-sulfat als eines der Endprodukte des komplexen Testosteronstoffwechsels anzusehen sei, da es nicht mehr weiter abgebaut wird.

In diesem Zusammenhang sind experimentelle Ergebnisse über den Metabolismus von sulfatverestertem Testosteron bei Ratten von Bedeutung. WU et al. (1965) fanden heraus, daß eine mikrosomale Ketosteroidreduktase der Rattenleber in der Lage ist, Testosteron-sulfat weiter zu DHT-sulfat zu reduzieren. Im übrigen wurde sulfokonjugiertes Testosteron, das zusammen mit freiem Testosteron im Reaktionsgemisch vorlag, erheblich schneller durch die Mikrosomenreduktase hydrogenisiert als das unkonjugierte männliche Sexualhormon.

Zu diesem Thema weiterführende Untersuchungen von MATSUI et al. (1972) bestätigen, daß der Steroidring A des in Ratten inkubierten ^3H -Testosteron-sulfats vollständig von mikrosomaler 5α -Hydrogenase metabolisiert wird. 5α - und 5β - C_{19} -Steroidsulfate bilden die wesentlichen Stoffwechselprodukte, wobei primär 5α -Androstadiol nachweisbar ist. MATSUI und Mitarbeiter zogen aus ihren und den bereits vorliegenden Ergebnissen den Schluß, daß die zu beobachtenden Diskrepanzen zwischen in vivo- und in vitro-Verhältnissen wahrscheinlich auf

spezifische Unterschiede der Membranpermeabilitäten für das Testosteron-sulfat zurückzuführen seien.

Als wichtige Vorläufer und Intermediärprodukte auf dem Stoffwechselweg zum sulfatveresterten Testosteron wurden von DIXON et al. (1965a) das DHEA und das Progesteron identifiziert. TAMM et al. (1966) wiesen das ADN als solches nach.

Im menschlichen Plasma isolierten und charakterisierten erstmals SAEZ et al. (1967) das Testosteron-sulfat. Auch DRAY und Mitarbeiter (1967) bestimmten unabhängig davon die Sulfatester von Epitestosteron bzw. Testosteron im Plasma gesunder Männer. Veröffentlichungen durch DESSY-PRIS et al. (1966) über einen indirekten Nachweis von Testosteron-sulfat im Urin mittels eines Ausschlußverfahrens nach Solvolyse und durch TAMM et al. (1966) über eine direkte Charakterisierung des sulfokonjugierten Testosterons im gleichen Medium vervollständigen die Darstellung in klinisch wichtigen Körperflüssigkeiten.

Nach Isolierung von DHEA-sulfat als eines der Hauptsekretionsprodukte der menschlichen Nebenniere (BAULIEU, 1962) wurde große Aufmerksamkeit auf die Biosynthesekapazität verschiedener endokriner Gewebe gelenkt, die freie Steroide zu sulfurylieren vermögen. ADAMS et al. (1963) berichteten, daß die Konjugation von Steroidhormonen mit Schwefelsäure nicht allein auf die Leber beschränkt sei. Sie wiesen Aktivitäten von Steroidsulfotransferasen und -kinasen in Nebennieren gesunder Individuen nach. Nach Inkubation von Testosteron in Nebennieren-Tumorgewebe isolierten LEBEAU und BAULIEU (1963) Testosteron-sulfat als Sekretionsprodukt. Dies gelang ebenfalls DIXON et al. (1965a) in einem virilisierenden Neoplasma der Nebenniere in vitro nach Injektion von ^{14}C -Progesteron. Hierbei wurden lediglich 7 % des Pro-

gesterons in sulfatverestertes Testosteron umgesetzt, ohne daß freies unkonjugiertes Sexualhormon nachweisbar gewesen wäre.

Zu gegensätzlichen Ergebnissen bezüglich der Sulfatveresterung in den Ovarien kamen ADAMS (1964) und WALLACE und Mitarbeiter (1964). Während WALLACE die Fähigkeit der Eierstöcke zur Sulfatesterbildung aus freien Steroiden als vorhanden beschrieb, konnte ADAMS keine Steroidsulfotransferasen im Ovar entdecken.

Zahlreiche Veröffentlichungen existieren zudem über die autonome Produktion bzw. Sulfurylationsfähigkeit von Testosteron-sulfat in gesunden und pathologisch veränderten Hoden menschlicher Individuen. Nach DIXON et al. (1965b) sind gesunde erwachsene Testikel in der Lage, aus injiziertem ^{14}C -Testosteron und aus ^3H -DHEA-sulfat sowohl ^{14}C - als auch ^3H -Testosteron-sulfat zu synthetisieren. Die Ausbeute an sulfokonjugiertem Testosteron beträgt dabei nur knapp 1 %. LAATIKAINEN et al. (1969) bestätigten in einer späteren Studie die Sekretion von Testosteron-sulfat in gesundem Hodengewebe. Im Falle eines Leydigzell-Tumors, der mit einer erhöhten Ausscheidung von 17-Ketosteroiden einhergeht, identifizierten LIPSETT et al. (1966) nach vorausgegangener Testosteroninjektion angestiegene Urinspiegel des sulfatveresterten Testosterons. Entsprechende Befunde erhob man auch bei Testikelfeminisationen (SAEZ et al., 1967).

Daß bereits ein 4-5 Monate alter menschlicher Foetus in der Lage ist, Testosteron-sulfat zu synthetisieren, beschrieben MANCUSO et al. (1967), in dem sie radioaktiv markiertes ^{14}C -Testosteron und 7α - ^3H -ADN in die intakte foeto-plazentare Zirkulation während einer Laparotomie

verabfolgten. ^{14}C -markiertes Testosteron-sulfat, welches in den Nebennieren isoliert worden war, entsprach bis auf 0,3 % dem gesamten ^{14}C -markierten Material, das in dem Foetus und in der Plazenta wiederentdeckt worden war. In einer weiterführenden Studie von BENAGIANO et al. (1968) über den Metabolismus von C_{19} -Steroiden in der foeto-plazentaren Einheit des Menschen wurde nach Perfusion von markiertem Testosteron und ADN das Testosteron-sulfat als der Hauptmetabolit in männlichen und weiblichen Foeten charakterisiert.

Während der Schwangerschaft besteht ein gradueller Testosteron-sulfat-Anstieg im mütterlichen Plasmaspiegel (SAEZ et al., 1969). Die Konzentration von sulfokonjugiertem Testosteron im Nabelstrang-Arterienblut übertrifft dabei diejenige in der Vena umbilicalis. Die Konzentrationen in diesen beiden Gefäßen liegen jeweils höher als der Spiegel im peripheren Plasma.

Schon BAULIEU et al. (1965) sprachen der menschlichen Plazenta die Fähigkeit zur Aromatisierung von Testosteron-sulfat ab. Ebenso konnten FRENCH und WARREN (1966) durch in vitro Experimente bestätigen, daß nach Inkubation von 17β -Testosteron-sulfat keine Hydrolyse des sulfokonjugierten Sexualhormons im Plazentagewebe stattfindet. Zwar ist die plazentare Mikrosomensulfatase in der Lage, DHEA-, Östrogen- und Cholesterol-sulfat zu hydrolysieren, nicht aber 17β -Steroidsulfate. Auch CHEATUM et al. (1968) fanden nach Inkubation von 7α - ^3H -Testosteron-sulfat in Mikrosomenäquivalente der Plazenta keinen Hinweis für eine direkte Aromatisierung in 17β -Östradiol-sulfat.

In vivo Studien nach Perfusion von drei Plazenten mit doppelt markiertem sulfatverestertem Testosteron während Laparotomie führten zu ähnlichen Resultaten (BENAGIANO et al., 1971). Man entdeckte den größten Teil des

radioaktiven Materials in den Plazenten und Perfusaten wieder. 99,5 % dieser Aktivitäten lagen in Form von konjugierten Steroiden vor; freie Testosteronmetaboliten fand man nicht. Im Urin wurde nur 2 % der Radioaktivität in den ersten 24 h nach Injektion nachgewiesen, davon etwa $\frac{2}{3}$ als Testosteron-sulfat. BENAGIANO schloß daraus, daß keine Hydrolyse von sulfokonjugiertem Testosteron in der Plazenta abläuft, daß ein großer Teil dieses von den Foeten sezernierten Testosteron-sulfats in unveränderter Form über die Plazenta zur Mutter transferiert wird und daß die Nieren den Hauptanteil des transferierten Testosteron-sulfats mit dem Urin ausscheiden. ERMINI et al. (1973) untersuchten während Laparotomie die weitere Stoffwechselung von ^3H -markiertem freien Testosteron und von ^{14}C -markiertem Testosteron-sulfat in zwei foeto-plazentaren Einheiten. Mehr als 99 % des ^{14}C -markierten Materials, das man in den verschiedenen Gewebeproben wiederentdeckte, waren wasserlösliche konjugierte Steroide. Über 70 % dieser ^{14}C -Aktivität stellte Testosteron-sulfat dar, mit Ausnahme in der Leber, in der sich lediglich 30 % wiederfinden ließ. Nach diesen Untersuchungen ist die foetale Nebenniere maßgeblich an der Sekretion von Testosteron-sulfat beteiligt, welches weder vom Foet noch von der Plazenta hydrolysiert werden kann.

In Untersuchungen zur Quantifizierung von Testosteron-sulfat im peripheren Plasma bestimmten SAEZ et al. (1967) folgende Konzentrationen für neun gesunde männliche und vier gesunde weibliche Individuen (Mittelwerte):

Testosteron-sulfat	
Männer	0,108 $\mu\text{g}\%$
Frauen	0,018 $\mu\text{g}\%$

DRAY et al. (1967) ermittelten bei experimentellen Analysen peripherer Plasmaproben gesunder erwachsener Männer ähnliche Werte: 0,120 $\mu\text{g}\%$ Testosteron-sulfat. Die peripheren Plasmaspiegel für sulfokonjugiertes Testosteron liegen nach diesen Ergebnissen also bei beiden Geschlechtern jeweils vier- bis fünfmal niedriger als die entsprechenden Konzentrationen von freiem Testosteron.

In pathologischen Fällen steigt der Testosteron-sulfat-Spiegel in Analogie zu dem des unkonjugierten Testosterons an. So betrug die Konzentration für Testosteron-sulfat im Blutplasma eines Patienten mit Pubertas praecox 0,832 $\mu\text{g}\%$ (SAEZ et al., 1967). Sie war damit auf das 8-fache des Normwerts gesunder erwachsener Männer erhöht. Auch bei Nebennieren-Tumoren und neoplastischen Veränderungen der Ovarien erhielten dieselben Autoren drei- bis viermal höhere Testosteron-sulfat-Werte im Nebennieren- und Ovarialvenenblut. Analoge Werte ergaben sich bei Hodenfeminisation im Plasma der Vena spermatica. Im 24-Stunden-Urin ermittelten DESSYPRIS et al. (1966) die Testosteron-sulfat-Produktionsraten gesunder erwachsener Männer mittels Gaschromatographie. Die einzelnen Werte bewegten sich zwischen 5 - 10 $\mu\text{g}/\text{die}$. Andere Konzentrationsbestimmungen von VOIGT et al. (1964) und TAMM et al. (1966) lagen mit 10 - 17 $\mu\text{g}/\text{die}$ nur gering darüber. Ergänzend dazu sollen die Ergebnisse für eine Gruppe älterer Frauen erwähnt werden, die extrem niedrige Testosteron-sulfat-Werte im Urin aufwiesen (CEDARD et al., 1972).

In einer experimentellen Studie von TAMM et al. (1966) stieg bei einem 37-jährigen Mann mit primärer Nebenniereninsuffizienz - der Patient erhielt pro Tag eine therapeutische Dosis von 30 mg Cortisol - nach Infusion von 20 mg ADN die Testosteron-sulfat-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin von anfänglich 10,2 $\mu\text{g}/\text{die}$ auf 134,0 $\mu\text{g}/\text{die}$ an.

Die Erhöhung liegt also um ein Vielfaches über der Norm.

Daß die Steroidsulfate im allgemeinen eine viel längere metabolische Clearancerate als die korrespondierenden freien Steroidhormone aufweisen, konnten WANG und BULBROOK (1967a und b) in grundlegenden Untersuchungen über Verstoffwechselungsraten bei Menschen, Ratten und Kaninchen aufzeigen. Sehr unterschiedlich stellten sich dabei die metabolischen Clearanceraten für freies und sulfo-konjugiertes Testosteron dar, was zum einen durch die längere Plasma-Halbwertszeit, zum anderen durch das relativ kleine Verteilungsvolumen des Testosteron-sulfats im Blutplasma bedingt ist. Die beiden Autoren fanden, daß bei erwachsenen Frauen die "Clearancekurve" des Testosteron-sulfats durch zwei Besonderheiten im Gesamtblut charakterisiert ist: 1. Durch eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit von weniger als 8 min. 2. Durch eine wesentlich längere Plasma-Halbwertszeit von ca. 205 min.

In einer anderen Studie beschreibt die Gruppe um SAEZ (1971) das Verschwinden von radioaktiv markiertem Testosteron-sulfat aus dem Plasma durch ein "3-Pool-Modell". Die Clearancekurve zeigt dabei einen schnellen initialen Abfall mit einer Plasma-Halbwertszeit von 15 min, gefolgt von einer zweiten Halbwertszeit von 35 - 74 min. Der dritte Abfall der Clearancekurve ist durch eine stark variierende Plasma-Halbwertszeit zwischen 102 - 333 min charakterisiert. Ein direkter Vergleich zwischen beiden Versuchsergebnissen ist schwierig, da WANG die metabolische Clearance im Gesamtblut bestimmte, SAEZ diese jedoch nur im peripheren Plasma.

Über eine weitere Plasma-Halbwertszeit für doppelt markiertes Testosteron-sulfat berichteten KNAPSTEIN et al. (1972). Sie betrug 20 min nach Injektion 53 min.

Der Mensch besitzt nach Experimenten von WANG et al. (1967a) eine viel längere Clearance für die Sulfatester von DHEA und Testosteron in der peripheren Zirkulation als die Ratte oder das Kaninchen. Der Grund dafür besteht in der Steroidsulfat-Bindung an menschliches Serumalbumin, das eine große Bindungskapazität für diese Steroidderivate aufweist (PLAGER, 1965). Außerdem scheinen gemeinsame Bindungsplätze für die Sulfatester von Testosteron und DHEA zu bestehen (WANG et al., 1967b).

Steroidsulfate zirkulieren im peripheren Plasma länger als die entsprechenden Glucuronidverbindungen, was eine höhere Plasmakonzentration der sulfatveresterten Steroide bewirkt (WANG et al., 1967a). Nach BONGIOVANNI et al. (1957) ist diese Tatsache hauptsächlich auf die langsame renale Clearancerate der Sulfate zurückzuführen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Durchführung des Experiments

Die Untersuchung wurde an einer 66-jährigen Patientin der Universitäts-Frauenklinik Mainz durchgeführt, bei der vor 18 Monaten die Vulva wegen eines Karzinoms radikal operiert worden war. Die postoperative Bestrahlung in typischer Weise war zwei Monate zuvor abgeschlossen worden.

Als Substrat diente $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -Testosteron-sulfat (New England Nuclear Corp., Ffm/Main, Deutschland). $100\ \mu\text{C}$ ($= 0,002\ \text{mg} = 110 \times 10^6\ \text{Ipm } ^3\text{H}$) wurden in 1,6 ml 25 %igen Äthanol in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und peripher intravenös injiziert. Nach 5, 15, 30, 60, und 120 min wurde aus einer anderen peripheren Vene jeweils 40 ml Blut entnommen und sofort heparinisiert. Das Plasma gewann man durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 2500 Upm. Der 24-Stunden-Urin wurde in zwei Portionen (Tab. 5) gesammelt. Plasma und Urin analysierte man nach der unten beschriebenen Methodik auf freie und konjugierte Steroide.

B. Chemische Aufarbeitung des Materials

1) Plasma

Freie Steroide ließen sich erschöpfend mit $3 \times 2,0$ Vol. Diisopropyläther extrahieren. Nach der Extraktion mit Diisopropyläther wurde ein geeignetes Aliquot des Gesamtextrakts der quantitativen Bestimmung der Radioaktivität im Liquid-Szintillations-Spektrometer (Fa. PACKARD, Modell TRICARB 3310) zugeführt. Damit ließen sich Verluste während der weiteren Auf-

arbeitung kontrollieren. Der Gesamtextrakt wurde mit 0,2 Vol. 1 N NaOH und 2,0 Vol. H₂O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Zur Gewinnung der gesamten Steroidkonjugate wurde das praeextrahierte Plasma mit 15 Vol. Äthanol-Aceton 1:1 (v/v) versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Die Radioaktivität des Gesamtkonjugatextraktes bestimmte man ebenfalls nach der ersten Extraktion in einem Aliquot quantitativ.

Nach Abnutschen der ausgefällten Proteine wurde das Lösungsmittel bei 37°C im Rotationsverdampfer bis auf 5 ml eingeengt und mit 2 x 15 ml Methanol-Chloroform 1:1 (v/v) aufgenommen. Der weiteren Reinigung von Lipoproteinen diente eine Lösungsmittelverteilung zwischen Ammoniumsulfat, pH = 3, sowie Äthylacetat. Die Konjugate wurden anschließend durch Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgelplatten F 254, die zuvor 1 h bei 100°C aktiviert worden waren, in den Systemen A und B (Tab. 1) in Sulfate und Glucuronide aufgetrennt. Die Sulfate unterwarf man dann einer Solvolyse in Äther-Perchlorsäure bei 40°C über 15 Stunden hinweg, wie von TREIBER und OERTEL (1967a und b) im einzelnen beschrieben. Die weitere Charakterisierung erfolgte nach der unten beschriebenen Methode.

2) Urin

Von dem in zwei Portionen gesammelten 24-Stunden-Urin wurde jeweils ein Aliquot von 50 ml aufgearbeitet. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität unterwarf man ein Aliquot von 1 ml der heißen Säurehydrolyse mit HCL, extrahierte im Anschluß mit Äther und bestimmte die Radioaktivität im Liquid-Szintillations-Spektrometer. So

ließen sich ebenfalls Verluste bei der Aufarbeitung kontrollieren.

Zur Gewinnung der gesamten Steroidkonjugate wurde der Urin mit Ammoniumsulfat gesättigt und mit 1 N HCL auf pH = 3 eingestellt. Man extrahierte mit 4 x 2 Vol. Äthylacetat. Um eine Solvolyse der Steroidkonjugate im organischen Lösungsmittel vorzubeugen, wurde sofort über Na-bikarbonat und Na-sulfat neutralisiert und danach getrocknet. Die Reinigung und Auftrennung von Sulfaten und Glucuroniden geschah durch erneute Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgelplatten F 254 im System B (Tab. 1). Bei der weiteren Charakterisierung der Konjugate verfuhr man wie oben beschrieben.

3) Charakterisierung freier Steroide

Die Isolierung und Charakterisierung einzelner bzw. aus den Konjugatfraktionen freigesetzter Steroide erfolgte durch wiederholte Dünnschicht-Chromatographie. Die zur Chromatographie benutzten Systeme sind in Tab. 1 (Seite 22) aufgeführt.

Die erste Auftrennung der freien radioaktiven Steroide geschah durch Dünnschicht-Chromatographie im System A. Nach Lokalisierung der radioaktiven Zonen auf den Dünnschichtplatten unter UV-Licht wurden die entsprechenden Strecken des Kieselgels von der Platte abgekratzt und die Steroide mit Methylenchlorid-Methanol 90:10 (v/v) extrahiert. Als Pilotensubstanzen ließ man am Rande der Kieselgelplatten Androstantriol, Androstandiol, Testosteron, 5 α -Dihydrotestosteron und Androstendion mitlaufen. Geeignete Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden dann der quantitativen Radioaktivitätsbestimmung im Liquid-Szintillations-Spektrometer zugeführt.

Zur endgültigen Charakterisierung unterzog man die einzelnen Metaboliten der Derivatbildung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und der Rechromatographie im System A. Durch Zugabe von jeweils 20 µg unmarkierter Standardsubstanzen ließen sich die einzelnen Steroide bis zur konstanten spezifischen Aktivität reinigen.

4) Derivatbildung

Die Herstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Ketosteroiden erreichte man nach der Methode von TREIBER und OERTEL (1967a und b) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,3 %-iger Trichloressigsäure in absolutem Benzol. Dann wurde der Trockenrückstand der Dünnschicht-Eluate nach Zugabe von jeweils 200 µg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 3 ml 0,3 %-iger Trichloressigsäure in absolutem Benzol aufgenommen. Im System C (Tab. 1) konnte man anschließend die farbigen Derivate als solche chromatographieren und quantitativ erfassen (Densitometer der Fa. SCHOEFFEL, Trappenkamp über Bornhöved, Deutschland).

System			Laufmittel
A	DSC*	Kieselgel F 254	Chloroform/Methanol/Ammoniak 20 : 5 : 0,5 (v/v)
B	DSC	Kieselgel F 254	Chloroform/Methanol/Ammoniak 15 : 5 : 0,2 (v/v)
C	DSC	Kieselgel F 254	Chloroform/Dioxan 94 : 6 (v/v)

* = Dünnschicht-Chromatographie

Tab. 1: Die zur Charakterisierung freier und konjugierter Steroide benutzten Chromatographie-Systeme.

Material (Vol., Zeit n. Inj.)	Freie Steroide	Steroid- sulfate	Glucuronide
Plasma-1 (22 ml, 5 min)	830	6830	-
Plasma-2 (22 ml, 15 min)	280	5060	-
Plasma-3 (18 ml, 30 min)	160	5180	-
Plasma-4 (19 ml, 60 min)	85	4140	-
Plasma-5 (19 ml, 120 min)	80	3910	-

Tab. 2: Konzentration der Gesamtradioaktivität (Ipm $^3\text{H}/\text{ml}$) in verschiedenen Fraktionen der einzelnen Plasma-proben.

Material	A T R L ¹⁾	A D L ²⁾	Testo ³⁾	D H T ⁴⁾	A D N ⁵⁾
Plasma 1+2	2650	17100	28860	7190	580
Plasma 3+4+5	2410	46510	32510	12240	1050

- 1) = Androstantriol
 2) = Androstandiol
 3) = Testosteron
 4) = 5 α -Dihydrotestosteron
 5) = Androstendion

Tab. 3: Verteilung der Radioaktivität (Ipm ³H) auf einzelne Metaboliten aus der Fraktion sulfokonjugierter Steroide in den Plasmaproben (nach Solvolyse).

Material (Vol., Zeit nach Inj.)	Freie Steroide (% der inj. Akt.)	Steroidsulfate (% der inj. Akt.)	Glucuronide
Urin-1 (400 ml, 0-5 h)	24580 (0,02%)	901760 (0,8%)	-
Urin-2 (700 ml, 6-24 h)	11130 (0,01%)	2323550 (2,1%)	-
Total (1100 ml, 0-24 h)	35710 (0,03%)	3225310 (2,9%)	-

Tab. 4: Verteilung der Gesamtradioaktivität (Ipm ³H) auf verschiedene Fraktionen der beiden Urinproben (injiziert wurden 110 x 10⁶ Ipm ³H).

Material	A T R L	A D L	Testo	D H T	A D N
Urin-1	6800	10460	34920	-	710
Urin-2	2400	3960	26660	-	760

Tab. 5: Verteilung der Radioaktivität (Ipm ^3H) auf einzelne Metaboliten aus den Sulfatfraktionen des Urins (nach Solvolyse).

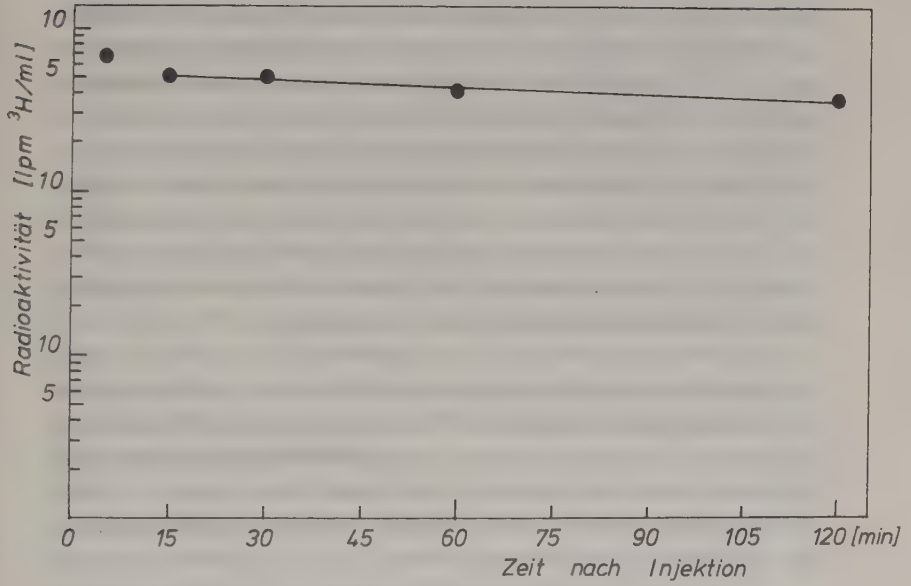


Abbildung 1: Halblogarithmische Auftragung der Konzentration sulfokonjugierter Steroide im Plasma.

IV. ERGEBNISSE

Im vorliegenden Experiment injizierte man einer 66-jährigen Patientin peripher intravenös $100 \mu\text{C} = 0,1 \mu\text{g} = 110 \times 10^6 \text{ Ipm } 7\alpha\text{-}^3\text{H}\text{-Testosteron-sulfat}$. In bestimmten Zeitabständen wurden aus einer anderen peripheren Vene fünf Plasmaproben entnommen und diese sowie der 24-Stunden-Urin der Patientin auf freie und sulfokonjugierte bzw. mit Glucuronsäure konjugierte Metaboliten von Testosteron-sulfat analysiert. Tabelle 2 (Seite 22) gibt die Konzentration der Gesamtaktivität ($\text{Ipm } ^3\text{H/ml}$) in verschiedenen Fraktionen der einzelnen Plasmaproben wieder. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich auf insgesamt 120 min. Neben Steroidsulfaten isolierte man auch freie Steroide. In der Fraktion der Steroidglucuronide wurden keine signifikanten Impulsraten gefunden.

Die Konzentration der Steroidsulfate nahm in den einzelnen Plasmaproben nahezu kontinuierlich ab. Bei halblogarithmischer Auftragung des Konzentrationsverhaltens der sulfokonjugierten Steroide im Plasma (Abbildung 1, Seite 25) ergab sich dabei eine Plasma-Halbwertszeit von mehr als 120 min.

Neben radioaktiv markierten Steroidsulfaten konnte man auch freie Steroide nachweisen. Diese zeigten gleichfalls eine Konzentrationsabnahme in den einzelnen Plasmaproben. Ihre Plasma-Halbwertszeit ließ sich jedoch wegen zu geringer Impulszahlen nicht errechnen. Im Vergleich zu den sulfokonjugierten Steroiden betrug die Konzentration der freien Steroide etwa 2 - 5 %. Die Verteilung der Radioaktivität ($\text{Ipm } ^3\text{H}$) auf einzelne Metaboliten aus der Fraktion sulfokonjugierter Steroide in den Plasmaproben nach Solvolyse ist in Tabelle 3 (Seite 23) dargestellt. Man vereinigte dabei die Proben 1 + 2 sowie die Proben

3 + 4 + 5 zu Einzelfraktionen, um höhere Impulsraten im Analysengang zu erhalten. Als Hauptmetabolit fand sich jeweils unverändertes Testosteron, daneben konnten auch Androstantriol, Androstandiol, 5 α -Dihydro-Testosteron sowie Androstendion nachgewiesen werden. In den vereinigten ersten beiden Plasmaproben war Testosteron zu 48 % metabolisiert worden, in den letzten drei Plasmaproben zu etwa 66,5 %. Die Impulszahlen in den Fraktionen der freien Steroide waren zu gering, als daß man einzelne Metaboliten hätte voneinander trennen und eindeutig charakterisieren können. Es wurde deshalb auf die weitere Analyse verzichtet.

Tabelle 4 (Seite 23) zeigt die Verteilung der mit dem 24-Stunden-Urin ausgeschiedenen Gesamtradioaktivität (Ipm ^3H) und die Zuordnung auf die verschiedenen Fraktionen freier und sulfokonjugierter Steroide. Auch im Urin ließen sich keine mit Glucuronsäure konjugierten Steroide identifizieren.

Die Gesamtausscheidung mit dem Urin in den ersten 24 Stunden betrug nur 2,93 % der injizierten Menge, In den ersten fünf Stunden erschienen davon lediglich 0,8 % der injizierten Radioaktivität in der Steroidsulfatfraktion und 0,02 % in der Fraktion freier Steroide. In der 6. - 24. Stunde wurden nochmals 2,1 % der injizierten Radioaktivität als Steroidsulfate und 0,01 % als freie Steroide mit dem Urin ausgeschieden.

Aus Tabelle 5 (Seite 24) geht die Verteilung der Radioaktivität auf die aus den beiden Urinproben isolierten Metaboliten von Testosteron hervor. Auch hier erfolgte eine Charakterisierung lediglich in der Fraktion der sulfokonjugierten Steroide nach Solvolyse,

da die Radioaktivität der freien Steroide zu gering war.

Wie im Plasma wurde auch im Urin Testosteron als quantitativ dominierender Metabolit charakterisiert. Daneben konnten Androstandiol, Androstantriol und Androstendion bestimmt werden. In der ersten Urinprobe errechnete man eine Metabolisierungsrate des Testosterons von 34 %, in der zweiten Urinprobe von etwa 22 %.

V. DISKUSSION

Radioaktiv markiertes Testosteron-sulfat kreist nach peripherer intravenöser Injektion lange im menschlichen Organismus. In der vorliegenden Studie beträgt seine Plasma-Halbwertszeit mehr als 120 min im beobachteten Zeitraum. Ähnlich lange Halbwertszeiten für sulfokonjugiertes Testosteron ermittelten KNAPSTEIN et al. (1972) mit 53 min im Plasma und WANG (1966) mit mehr als 205 min im Gesamtblut. Offensichtlich findet eine signifikante, wenn auch nur geringe Spaltung des Sulfates statt. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß im Plasma ebenfalls Impulsraten der Fraktion freier Steroide eindeutig nachgewiesen werden konnten. Die Plasma-Halbwertszeit der freien Steroide ließ sich jedoch nicht berechnen, da ja eine stetige Umwandlung der freien Steroide in Sulfate sowie eine Wiederspaltung der Steroidsulfate in unkonjugierte Steroide stattfindet.

In diesem Experiment war auffallend, daß sich keine radioaktiv markierten Steroide als Glucuronide identifizieren ließen. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei anderen Untersuchungen von SANDBERG et al. (1956) und KNAPSTEIN et al. (1972) nach intravenöser Injektion von radioaktiv markiertem freien Testosteron eine rasche Konjugierung sowohl mit Schwefelsäure als auch mit Glucuronsäure. Man errechnete dabei eine kurze Plasma-Halbwertszeit von 8 bzw. 8,5 min.

In der vorliegenden Studie wurden übereinstimmend mit den Plasmawerten auch keine radioaktiv markierten Metaboliten in den Glucuronidfraktionen des 24-Stunden-Urins analysiert.

Das im Plasma zirkulierende Testosteron-sulfat unterliegt einem ausgedehnten Metabolismus am Steroidmolekül. Vorausgegangene Untersuchungen von KNAPSTEIN et al. (1972) hatten gezeigt, daß dieser Metabolismus ohne Spaltung der Sulfatesterbindung am C-Atom Nr. 17 erfolgen kann.

Erstaunlich war im vorliegenden Experiment das Ausmaß der Verstoffwechselung im Plasma. Schon nach 15 min waren mehr als 48 % des Testosteron-sulfats in Androstadiol, Androstantriol, 5 α -Dihydrotestosteron bzw. Androstendion umgewandelt worden. In den folgenden 105 min wurden dann über 66 % des im Plasma kreisenden Testosteron-sulfats metabolisiert. Interessant erscheint die Isolierung von Androstendion als Sulfat. Da eine Ketobindung zwischen der O-Gruppe am C-Atom Nr. 17 und dem Sulfatrest nicht möglich ist, muß es sich dabei um das 3,4-dienol-Sulfokonjugat von Androstendion handeln. Entsprechende Ergebnisse wurden bereits von KNAPSTEIN et al. (1972) berichtet.

Die Ausscheidung der als Testosteron-sulfat injizierten Radioaktivität mit dem 24-Stunden-Urin war mit insgesamt weniger als 3 % auffallend gering. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten um die Gruppe von BAULIEU (1965), der fünf Tage nach Injektion von radioaktiv markiertem Testosteron-sulfat 3,5 % der Radioaktivität mit dem Urin wiederentdeckte.

Auch BENAGIANO et al. (1971) und KNAPSTEIN et al. (1972) errechneten korrespondierende Werte für die im 24-Stunden-Urin wiederentdeckte Radioaktivität mit 2,0 % bzw. 3,1 %. Diese sehr schlechte Nierengängigkeit findet eine Erklärungsmöglichkeit in der langen Plasma-Halbwertszeit des Testosteron-sulfats von über zwei Stunden.

Im vorliegenden Experiment bestand darüberhinaus eine Diskrepanz hinsichtlich der Metabolisierungsrate des injizierten Testosteron-sulfats einerseits im 24-Stunden-Urin und andererseits im Plasma. Während in den letzten drei Plasmaproben mehr als 66 % von Testosteron-sulfat metabolisiert vorgefunden wurden, waren es im Urin nur maximal 34 %. Dieser deutliche Unterschied läßt den möglichen Rückschluß zu, daß die Sulfokonjugate des Testosterons bzw. seiner Metaboliten eine unterschiedlich große Nierenschwelle besitzen. Eine einfachere Erklärung ergäbe sich durch unterschiedliche Verlustraten bei der Aufarbeitung der Plasma- und Urinproben.

In früheren Untersuchungen war das im Urin ausgeschiedene Testosteron-sulfat in einem viel stärkeren Maße metabolisiert worden (KNAPSTEIN et al., 1972; ERMINI et al., 1973). Als Hauptmetabolit im Urin ließ sich jedoch übereinstimmend mit den bisher in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimenten das Testosteron-sulfat identifizieren (BENAGIANO et al., 1971; KNAPSTEIN et al., 1972).

Da auch im Urin der überwiegende Anteil der Radioaktivität in der Sulfatfraktion erschien - wie bereits vorausgegangene Untersuchungen von ERMINI et al. (1973) u.a. bestätigen - kann wiederum angenommen werden, daß der Metabolismus mindestens zu einem Teil am ungespaltenen Testosteron-sulfat-Molekül abgelaufen ist.

Zusammenfassend läßt sich aus den hier vorliegenden Ergebnissen feststellen, daß das injizierte Testosteron-sulfat im menschlichen Organismus kaum hydrolysiert wird, eine lange Plasma-Halbwertszeit besitzt und eine dementsprechend geringe Ausscheidung im 24-Stunden-Urin auf-

weist. Die Untersuchung konnte somit zeigen, daß das radioaktiv markierte Testosteron-sulfat nach intravenöser Injektion einem ausgedehnten Metabolismus im Körper des Menschen unterliegt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Nach intravenöser Injektion von 100 μC $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -Testosteron-sulfat bei einer 66-jährigen Patientin wurden dieser in bestimmten Zeitabständen fünf Blutproben aus einer peripheren Vene entnommen und der Urin über 24 Stunden hinweg gesammelt. Man analysierte das Plasma und den Urin auf freie und sulfokonjugierte Steroide. Dabei stellte man fest, daß Testosteron-sulfat über einen langen Zeitraum im Plasma kreist. Seine Plasma-Halbwertszeit beträgt mehr als zwei Stunden. Neben radioaktiv markierten Steroidsulfaten ließen sich im Plasma auch signifikante Mengen freier Steroide identifizieren, ohne daß ihre Plasma-Halbwertszeit zu errechnen war. Testosteron, Hauptmetabolit der Fraktion sulfokonjugierter Steroide im Plasma, wurde in den ersten 15 min nach Injektion zu 48 % metabolisiert, in den folgenden 105 min zu 66,5 %. Als weitere sulfatveresterte Steroide konnten Androstandiol, Androstantriol, 5α -Dihydrotestosteron sowie Androstendion im Plasma nachgewiesen werden.

Nur 2,9 % der injizierten Radioaktivität wurde in 24 Stunden mit dem Urin ausgeschieden; fast 99 % davon als Steroidsulfate. Auffallend war die schlechte Nierengängigkeit und die geringe Hydrolyse des Testosteron-sulfat-Moleküls. In der Steroidsulfatfraktion des Urins ließen sich neben dem wiederum quantitativ hervorstehenden Testosteron mit Androstandiol, Androstantriol und Androstendion weitere Metaboliten charakterisieren. Testosteron-sulfat wurde im 24-Stunden-Urin zu 34 % metabolisiert. Insgesamt konnten die Ergebnisse früherer Untersuchungen aus unserem Labor als auch die anderer Autoren weitgehend bestätigt werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, J.B.: Formation of steroid sulfates by extracts of human adrenals.
Biochim. Biophys. Acta 71, 243-45 (1963)
2. ADAMS, J.B.: Enzymic synthesis of steroid sulfates.II.
J. Clin. Endocr. 24, 988-98 (1964)
3. ANDERSON, K.M.; S. LIAO:
Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei.
Nature (London) 219, 277-79 (1968)
4. BAULIEU, E.E.: Three sulfate esters of 17-ketosteroids in the plasma of normal subjects and after administration of ACTH.
J. Clin. Endocr. 20, 900-04 (1960)
5. BAULIEU, E.E.: Studies on conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J. Clin. Endocr. 22, 501-10 (1962)
6. BAULIEU, E.E.: Thèse de Doctorat des Sciences.
Fac. Sci. Paris, p. 282 (1963)
Zit. in Rec. Progr. Horm. Res. 21, 490 (1965)
7. BAULIEU, E.E.; P. MAUVAIS-JARVIS:
Studies on testosterone metabolism.II.
Metabolism of testosterone-4-¹⁴C and androst-4-one-3,17-dione-1,2-³H.
J. Biol. Chem. 239, 1578 (1964)

8. BAULIEU, E.E.; C. CORPECHOT; F. DRAY; R. EMILIOZZI;
M.C. LEBEAU; P. MAUVAIS-JARVIS; P. ROBEL:
An adrenal secreted "androgen": Dehydro-
isoandrosterone sulfate. Its metabolism
and a tentative generalisation on the me-
tabolism of other steroid conjugates in man.
Rec. Progr. Horm. Res. 21, 411-500 (1965)
9. BENAGIANO, G.; S. MANCUSO; F.P. MANCUSO; N. WIKVIST;
E. DICZFALUSY:
Studies on the metabolism of C₁₉-steroids
in the human foeto-placental unit. III.
Dehydrogenation and reduction products
formed by previable foetuses perfused
with androstenedione and testosterone.
Acta Endocr. 57, 187-207 (1968)
10. BENAGIANO, G.; M. ERMINI; B. DELA TORRÈ; N. WIKVIST;
E. DICZFALUSY:
Studies on the metabolism of C₁₉-steroids
in the human foeto-placental unit. V.
Placental transfer of testosterone sulfate
at midgestation.
Acta Endocr. 66, 653-65 (1971)
11. BONGIOVANNI, A.M.; W.R. EBERLEIN:
The renal clearance of neutral 17-keto-
steroids in man.
J. Clin. Endocr. 17, 238-49 (1957)
12. BREUER, H.:
Comparative studies on aromatic neutral
steroids in man.
Acta Endocr. 40, 111-22 (1962)

13. BRUCHOVSKY, N.; J.D. WILSON:

The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro.

J. Biol. Chem. 243, 2012-21 (1968)

14. BURGER, H.G.; J.R. KENT; A.E. KELLIE:

Determination of testosterone in human peripheral and adrenal venous plasma.

J. Clin. Endocr. 24, 432-41 (1964)

15. CALVIN, H.I.; R.L. VANDE WIELE; S. LIEBERMAN:

Evidence that steroid sulfates serve as biosynthetic intermediates: In vivo conversion of pregnenolone-sulfate-³⁵S to dehydroisoandrosterone-sulfate-³⁵S.

Biochem. (Wash.) 2, 648-53 (1963)

16. CAMACHO, A.M.; C.J. MIGEON:

Studies on the origin of testosterone in the urine of normal adult subjects and patients with various endocrine disorders.

J. Clin. Invest. 43, 1083-89 (1964)

17. CEDARD, L.; P. CARRIAT; C. CORPEchot:

Etude du sulfate de déhydroépiandrostérone endogène et exogène chez les femmes âgées.

Gerontol. Clin. (Basel) 14, 160-71 (1972)

18. CHEATUM, S.G.; J.C. DIEBOLD; J.C. WARREN:

Failure of placental microsomes to aromatize testosterone sulfate.

J. Clin. Endocr. 28, 916-18 (1968)

19. DE MEIO, R.H.; C. LEWICKA:

In vitro synthesis of dehydroepiandrosterone sulfate.

Endocr. 56, 489-90 (1955)

20. DESSYPRIS, A.; M.A. DROSDOWSKY; N.L. MC NIVEN; R.I. DORFMAN:

Identification of testosterone sulfate in the urine of normal adult subjects.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 1128-30 (1966)

21. DIXON, W.R.; J.G. PHILLIPS; N. KASE:

In vitro production of testosterone sulfate from progesterone-4-¹⁴C in an adrenal tumor.

Steroids 6, 81-87 (1965a)

22. DIXON, W.R.; V. VINCENT; N. KASE:

Biosynthesis of steroid sulfates by normal human testis.

Steroids 6, 757-69 (1965b)

23. DORFMAN, R.I.; F. UNGAR:

Metabolism of steroid hormones.

Academic Press, New York 1965

24. DRAY, F.; I. MOWSZOWICZ; M.J. LEDRU:

Identification and measurement of epitestosterone in the sulfate fraction of plasma of normal men.

Steroids 10, 501-07 (1967)

25. ERMINI, M.; G. BENAGIANO; B. DELA TORRE; E. DICZFALUSY:

Studies on the metabolism of C₁₉-steroids in the foeto-placental unit. VI. Formation and metabolism of testosterone sulfate in the intact foeto-placental unit.

Acta Endocr. 72, 786-800 (1973)

26. FRENCH, A.P.; J.C. WARREN:

Sulfatase activity in the human placenta.
Steroids 8, 79-85 (1966)

27. HALL, P.F.; K.B. EIK-NES:

The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the production of pregnenolone by rabbit testis in the presence of an inhibitor of 17α -hydroxylase.

Biochim. Biophys. Acta 86, 604-09 (1964)

28. HORTON, R.: Estimation of androstenedione in human peripheral blood with ^{35}S -thiosemicarbazide.

J. Clin. Endocr. 25, 1237-43 (1965)

29. HORTON, R.; J. SHINSAKO; P.H. FORSHAM:

Testosterone production and metabolic clearance rates with volumes of distribution in normal adult men and women.

Acta Endocr. 48, 446-58 (1965)

30. HORTON, R. ; J.F. TAIT:

Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its interconversion to testosterone.

J. Clin. Invest. 45, 301-13 (1966)

31. ITO, T.; R. HORTON:

The source of plasma dihydrotestosterone in man.

J. Clin. Invest. 50, 1621-27 (1971)

32. KNAPSTEIN, P.; W. WORTMANN; C. KRÄMER:
Metabolism and plasma half life of ^{14}C -
testosterone plus ^3H -testosterone- ^{35}S sulfate
perfused through human liver or injected
intravenously.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 153,
1447-53 (1972)
33. KORENMAN, S.G.; H. WILSON; M.B. LIPSETT:
Testosterone production rates in normal
adults.
J. Clin. Invest. 42, 1753-60 (1963)
34. KORENMAN, S.G.; M.A. KIRSCHNER; M.B. LIPSETT:
Testosterone production in normal and viri-
lized women and in women with the Stein-
Leventhal syndrome or idiopathic hirsutism.
J. Clin. Endocr. 25, 798-803 (1965)
35. KRÜSKEMPER, H.L.:
Anabole Steroide.
Thieme, Stuttgart 1965
36. KUMARI, L.; J.W. GOLDZIEHER:
In vitro steroidogenesis in normal human
ovarian tissue.
Acta Endocr. 52, 455-64 (1966)
37. LAATIKAINEN, T.; E.A. LAITINEN; R. VIHKO:
Secretion of neutral steroid sulfates by
the human testis.
J. Clin. Endocr. 29, 219-24 (1969)
38. LEBEAU, M.C.; E.E. BAULIEU:
In vitro biosynthesis of corticosteroid
sulfates by adrenal tumoral tissue.
Endocrinol. 73, 832-34 (1963)

39. LIPSETT, M.B.; G.A. SARFATY; S.H. WILSON; C.W. BARDIN:
Metabolism of testosterone and related
steroids in metastatic interstitial cell
carcinoma of the testis.
J. Clin. Invest. 45, 1700-09 (1966)
40. MANCUSO, S.; G. BENAGIANO; B. FRÖSA; E. DICZFALUSY:
Formation of testosterone sulfate by the
foetus in vivo.
Biochim. Biophys. Acta 144, 183-85 (1967)
41. MATSUI, M.; F. ABE; K. KIMURA:
Comparative studies on the metabolic hydro-
genation of the ring A in testosterone and
its conjugates by male rat liver in vitro.
Chem. Pharm. Bull. 20, 1913-20 (1972)
42. MAUVAIS-JARVIS, P.; E.E. BAULIEU:
Studies on testosterone metabolism.IV. Uri-
nary 5 α - and 5 β -androstenediol and testoste-
rone glucuronide from testosterone and
dehydroisoandrosterone sulfate in normal
people and hirsute women.
J. Clin. Endocr. 25, 1167-78 (1965)
43. MENON, K.M.J.; R.I. DORFMAN; E. FORCHIELLI:
The obligatory nature of cholesterol in the
biosynthesis of testosterone in rabbit testis
slices.
Steroids Suppl. 2, 165-75 (1965)
44. OVERBEEK, G.A.: Anabole Steroide.
Springer, Berlin 1966

45. PLAGER, J.E.: The binding of androsterone sulfate, etio-
cholanolone sulfate, and dehydroisoandro-
sterone sulfate by human plasma protein.
J. Clin. Invest. 44, 1234-39 (1965)
46. RICE, B.F.; J. HAMMERSTEIN; K. SAVARD:
Steroid hormone formation in the human
ovary. II. Action of gonadotropins in
vitro in the corpus luteum.
J. Clin. Endocr. 24, 606-15 (1964)
47. SAEZ, J.M.; S. SAEZ; C.J. MIGEON:
Identification and measurement of testo-
sterone in the sulfate fraction of plasma
of normal subjects and patients with
gonadal and adrenal disorders.
Steroids 9, 1-14 (1967)
48. SAEZ, J.M.; J. BERTRAND:
Androgen studies in the foeto-placental
unit.
Excerpta med. (Amst.), Intern. Congr. Ser.
No 183, 132-41 (1969)
49. SAEZ, J.M.; J. BERTRAND; C.J. MIGEON:
Metabolic clearance rate, urinary and
plasma production rates of testosterone
sulfate in man.
Steroids 17, 435-52 (1971)
50. SANDBERG, A.A.; W.R. SLAUNWHITE:
Metabolism of 4-¹⁴C-testosterone in human
subjects. I. Distribution in bile, blood,
feces and urine.
J. Clin. Invest. 35, 1331-39 (1956)

51. SAVARD, K.; R.I. DORFMAN; E. POTASSE:
Biogenesis of androgens in the human testis.
J. Clin. Endocr. 12, 935 (1952)
52. SJÖVALL, J.; R. VIHKO:
Determination of androsterone and dehydro-
epiandrosterone sulfates in human serum
by gas-liquid chromatographie.
Steroids 6, 597-604 (1965)
53. STRAUSS, J.S.; A.M. KLIGMAN; P.E. POCHI:
The effect of androgens and oestrogens on
human sebaceous glands.
J. Invest. Derm. 39, 139-53 (1962)
54. TAMM, J.; U. VOLKWEIN; Z. STARCEVIC:
The urinary excretion of epitestosterone,
testosterone and androstenedione following
intravenous infusions of high doses of
these steroids in human subjects.
Steroids 8, 659-69 (1966)
55. TAMM, J.:
Testosteronstoffwechsel beim Menschen.
Dtsch. Med. Wschr. 92, 1983-87, 2037-41,
2080-86 (1967)
56. TAMM, J.; U. VOLKWEIN; K.D. VOIGT:
Die Isolierung von 17 β -hydroxyandrost-
4-en-3-on-17-sulfat (Testosteron-sulfat)
aus männlichem Urin.
Experientia 23, 299-300 (1967)
57. TAMM, J.; K.D. VOIGT:
Weitere Untersuchungen zur Interkonversion
von Testosteron und 17-Epitestosteron beim
Menschen.
Symp.Dtsch.Ges.Endocr. No 14, 354-55 (1968)

58. TAMM, J.; K.D. VOIGT:

Einige klinisch relevante Ergebnisse der neueren Androgenforschung.

Schweiz. Med. Wschr. 101, 1078-83 (1971)

59. TREIBER, L.; G.W. OERTEL:

Determination of 17-ketosteroids with 2,4-DNPH. I.

Z. Klin. Chem. 5, 83-86 (1967a)

60. TREIBER, L.; G.W. OERTEL:

Determination of 17-ketosteroids with 2,4-DNPH. II.

Z. Klin. Chem. 5, 101-06 (1967b)

61. TWOMBLY, G.H.; M. LEVITZ:

Metabolism of oestrone-¹⁴C-¹⁶Sulfate in women.

Amer. J. Obstet. Gynec. 80, 889-98 (1960)

62. VERMEULEN, A.; L. VERDENNEK; R. DANEELS:

Studies on delta⁴-androstene-3,17-dione and testosterone metabolism.

Excerpta med. (Amst.), Intern. Congr. Ser. No 111, Abst 522 (1966)

63. VOIGT, K.D.; U. VOLKWEIN; J. TAMM:

Eine Methode zur Bestimmung der Testosteron-Ausscheidung im Urin.

Klin. Wschr. 42, 642-44 (1964)

64. WALLACE, E.Z.; S. LIEBERMAN:

Biosynthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by human adrenocortical tissue.

J. Clin. Endocr. 23, 90-94 (1963)

65. WALLACE, E.Z.; N. SILBERMAN:
Biosynthesis of steroid sulfates by
human ovarian tissue.
J. Biol. Chem. 239, 2809-12 (1964)
66. WANG, D.Y.: Studies on androgen sulfates.
Excerpta med. (Amst.), Intern. Congr. Ser.
No 101, 190-91 (1966)
67. WANG, D.Y.; R.D. BULBROOK; A. SNEDDON; T. HAMILTON:
The metabolic clearance rates of dehydro-
epiandrosterone, testosterone and their
sulfate esters in man, rabbit and rat.
J. Endocr. 38, 307-18 (1967a)
68. WANG, D.Y.; R.D. BULBROOK:
Binding of the sulfate esters of dehydro-
epiandrosterone, testosterone, 17-acetoxy-
pregnenolone and pregnenolone in the
plasma of man, rabbit and rat.
J. Endocr. 39, 405-13 (1967b)
69. WILSON, J.D.: Mechanism of action of testosterone.
N. Engl. J. Med. 287, 1284-91 (1972)
70. WORTMANN, W.; P. KNAPSTEIN; G. MAPPES; G.W. OERTEL:
In vivo perfusion of the human liver with
 7α - ^3H -testosterone.
Symp.Dtsch. Ges.Endocr. 16, 396-98 (1970)
71. WOTIZ, H.H.; B.S. ZISKIND; H.M. LEMON:
Studies on steroid metabolism. VIII.
Cancer Res. 20, 34-37 (1960)
72. WU, H.L.C.; M. MASON:
Hydrogenation of testosterone sulfate by
the δ^4 -3-ketosteroid reductase of
rat liver microsomes.
Steroids 5, 45-51 (1965)

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. P. Knapstein für die Überlassung des Themas und seinen wertvollen Rat bei der Ausführung der hier vorliegenden Arbeit.

Frau Ch. Nussbaum-Krämer danke ich für ihre Unterstützung und Beratung beim experimentellen Teil der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 6.6.1951 wurde ich als Sohn des Realschullehrers Gustav Schröder und seiner Ehefrau Ingrid, geborene Reichert, in Eutin/Holstein geboren.

Von April 1958 bis 1962 besuchte ich die Bezirksvolkschule in Eutin. 1962 wechselte ich dann zur Johann-Heinrich-Voß-Schule in Eutin über, wo ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums besuchte. Am 19.6.1970 legte ich die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Nach bestandener naturwissenschaftlicher und ärztlicher Vorprüfung legte ich am 14.7.1976 die ärztliche Prüfung in Mainz ab.

Seit dem 15.10.1976 bin ich als Medizinalassistent am Pathologischen Institut der Universitätskliniken Mainz tätig.

